

DOCKET NO:

0018-1093-0 PCT

09/446913  
514 Rec PCT/PTO 04 JAN 2000

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Shigeki ONO, et al.  
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION  
FILED: HEREWITH  
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP98/03011  
INTERNATIONAL FILING DATE: 03 July 1998  
FOR: BRAIN-PROTECTIVE AGENT

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

| <b><u>COUNTRY</u></b> | <b><u>APPLICATION NO</u></b> | <b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b> |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| JAPAN                 | 9/180050                     | 04 JULY 1997                 |

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP98/03011**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
William E. Beaumont  
Registration No. 30,996

Crystal Square Five  
Fourth Floor  
1755 Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
(703) 413-3000

800 HAL 4 C 073705 000414

09/446913

PCT/JP98/03011

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

03.07.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年 7月 4日

REC'D 21 AUG 1998

WIPO

PCT

出願番号  
Application Number:

平成 9年特許願第180050号

出願人  
Applicant(s):

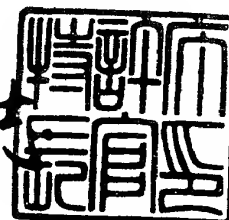
藤沢薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山佐 建志



出証番号 出証特平10-3062460

特平 9-180050

【書類名】 特許願  
【整理番号】 FP04690-00  
【提出日】 平成 9年 7月 4日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K48/00  
【発明の名称】 脳保護剤  
【請求項の数】 4  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市東古松1丁目7-19-803  
    【氏名】 小野 成紀  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県岡山市北方3丁目6-5  
    【氏名】 伊達 勲  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000005245  
    【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社  
    【代表者】 藤山 朗  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 016621  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脳保護剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 NF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳保護剤。

【請求項2】 脳疾患に起因する脳障害に対する請求項1記載の脳保護剤。

【請求項3】 脳疾患が脳血管障害であるところの請求項2記載の脳保護剤。

【請求項4】 脳疾患に起因する脳障害が、くも膜下出血に伴う脳血管攣縮であるところの請求項2記載の脳保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、NF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳保護剤、特に脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護剤に関するものである。詳細には、NF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護剤および、該デコイを含有する脳保護剤を使用する脳保護方法に関する。

【0002】

【従来技術】

転写調節因子NF- $\kappa$ Bは、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患等の様々な疾患に関与していると考えられており、そのデコイの投与がそれらの疾患の治療および予防に有効であると考えられている(WO96/35430参照)。

転写調節因子NF- $\kappa$ Bは、p65とp50のヘテロダイマーからなっている。通常は、細胞質内に阻害因子I $\kappa$ Bが結合した形で存在し、核移行が阻止されている。ところが、何らかの原因でサイトカインや、虚血、再灌流といった何らかの刺激が加わるとI $\kappa$ Bがリン酸化され、分解されることにより、NF- $\kappa$ Bが活性化されて核内に移行する。NF- $\kappa$ Bは染色体のNF- $\kappa$ B結合部位に結合することにより、その下流にある遺伝子の転写を促進する。NF- $\kappa$ Bにより制御される遺伝子には、例えば、IL-1、IL-6、IL-8などのサイトカイン類や、VCAM-1やICAM-1などの接着因子がある。

【0003】

一方、脳疾患において、脳神経細胞死等の様々な原因により脳障害が起こることが知られており、近年、脳保護の必要性が認識されている。

例えば、破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血の治療成績は、手術用顕微鏡の導入以後、動脈瘤クリッピング術が安全に行われるようになり、飛躍的に向上した。しかし、くも膜下出血に伴い出現する脳血管攣縮などの脳障害に対しては、その発生機序についても解明されておらず、さらに確実な治療法の確立もない。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、NF- $\kappa$ Bの制御下にあるサイトカイン類や細胞接着因子の生産の活性化が、脳疾患に起因する脳障害（例えば、くも膜下出血後の脳血管攣縮や、脳血管障害や重傷頭部外傷の予後の脳神経細胞死）を引き起こす一つの原因となっていると予測し、鋭意研究の結果、脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護には、NF- $\kappa$ Bのデコイ、すなわちNF- $\kappa$ Bが結合する核酸と特異的に拮抗する化合物を投与することが特に有効であることを見だし、本発明を完成した。

【0005】

すなわち、本発明は、NF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳保護剤さらに詳しくはNF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護剤および保護方法を提供するものである。

本発明の脳保護剤の対象とする疾患は、特に限定されないが、特に、脳組織において、転写調節因子NF- $\kappa$ Bが制御する遺伝子の所望しない活性化に起因する脳障害に有効であり、例えばくも膜下出血後の脳血管攣縮や、脳血栓症および脳塞栓等の脳梗塞、脳出血後後遺症、脳血管性痴呆、水頭症、脳動脈奇形・血管腫、各種脳腫瘍、パーキンソン症候群、脳動脈硬化症、髄膜炎（細菌性、無菌性、術後等）、脳炎、エイズ、各種の脳症（バークエット脳症、多発性硬化症）や重傷頭部外傷による脳神経細胞死による脳障害が含まれる。特に本発明により得られるNF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳保護剤は、くも膜下出血に伴い出現する脳血管攣縮の治療および予防には好適である。

【0006】

本発明で用いられるNF- $\kappa$ Bのデコイとしては、染色体上に存在するNF- $\kappa$ Bの核酸結合部位と特異的に拮抗する化合物であればよく、例えば核酸およびその類似体が含まれる。好ましいNF- $\kappa$ Bのデコイの例としては、核酸配列NF- $\kappa$ B結合部位のコンセンサス配列を含むオリゴヌクレオチド、その変異体、またはこれらを分子内に含む化合物があげられる。オリゴヌクレオチドはDNAでもRNAでもよく、またそのオリゴヌクレオチド内に核酸修飾体または／および擬核酸を含むものであってもよい。また、これらのオリゴヌクレオチド、その変異体、またはこれらを分子内に含む化合物は1本鎖でも2本鎖であってもよく、線状であっても環状であってもよい。変異体とは上記配列の一部が、変異、置換、挿入、欠失しているもので、NF- $\kappa$ Bが結合する核酸結合部位と特異的に拮抗する核酸を示す。さらに好ましいNF- $\kappa$ Bのデコイとしては、上記核酸配列を1つまたは数個含む2本鎖オリゴヌクレオチドまたはその変異体があげられる。本発明で用いられるオリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合部の酸素原子をイオウ原子で置換したチオリン酸ジエステル結合をもつオリゴヌクレオチド(S-オリゴ)、または、リン酸ジエステル結合を電荷をもたないメチルホスフェート基で置換したオリゴヌクレオチド等の生体内でオリゴヌクレオチドが分解を受けにくくするために改変したオリゴヌクレオチド等が含まれる。

【0007】

本発明で用いられるNF- $\kappa$ Bのデコイの製造方法としては、一般的な化学合成法または生化学合成法を用いることが出来る。例えばNF- $\kappa$ Bのデコイとして核酸を用いる場合、遺伝子工学で一般的に用いられる核酸合成法を用いることが出来、例えば、DNA合成装置を用いて目的のデコイヌクレオチドを直接合成してもよいし、またこれらの核酸、それを含む核酸またはその一部を合成した後、PCR法またはクローニングベクター等を用いて核酸を増幅してもよい。さらに、これらの方法により得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断、DNAリガーゼ等を用いて結合等を行い目的とする核酸を製造してもよい。また、さらに細胞内でより安定なデコイヌクレオチドを得るために、核酸の塩基、糖、リン酸部分を例えばアルキル化、アシル化等の化学修飾を施してもよい。

【0008】

本発明により得られるNF- $\kappa$ Bのデコイを主成分として含有する製剤は、主薬が患部の細胞または目的とする組織の細胞内に取り込まれるような製剤であれば特に限定されるものではなく、NF- $\kappa$ Bのデコイ単独で、もしくは慣用の担体と混合して、経口投与、非経口投与、局所投与ないしは外用の形で投与される。これらの製剤は溶液、懸濁液、シロップ、リポソーム製剤、乳剤、シロップ等の液体の投与形態であってもよいし、錠剤、顆粒剤、粉末剤、カプセル剤などの固形の投与形態であってもよい。必要に応じ、上記製剤には各種の担体、助剤、安定剤、潤滑剤、その他一般に使用される添加剤、例えば乳糖、クエン酸、酒石酸、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、白陶土、蔗糖、コーンスターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、落下生油、オリーブ油、カカオバター、エチレングリコールなどを添加することができる。

【0009】

特に、NF- $\kappa$ Bのデコイとして核酸またはその修飾体を用いる場合の好ましい製剤としては、一般に用いられている遺伝子導入法で用いられる形態、例えばセンダイウイルス等を用いた膜融合リポソーム製剤やエンドサイトーシスを利用するリポソーム製剤等のリポソーム製剤、リポフェクトアミン（ライフテックオリエンタル社製）やTf $\times$ 50等のカチオン性脂質を含有する製剤またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等を用いるウイルス製剤を用いるのが有利である。

【0010】

リポソーム製剤は、そのリポソームの構造体が、大きな1枚膜リポソーム（LUV）、多重層リポソーム（MLV）、小さな一枚膜リポソーム（SUV）のいずれであってもよい。その大きさも、LUVでは200から1000nm、MLVでは400から3500nm、SUVでは20から50nm程度の粒子系をとり得るが、センダイウイルス等を用いる膜融合リポソーム製剤の場合は粒子系200から1000nmのMLVを用いるのが好ましい。

【0011】

リポソームの製造方法は、デコイが保持されるものであれば特に限定されるものではなく、慣用の方法、例えば逆相蒸発法（Szoka, F., et al: Biochim. Biophys.



s. Acta, Vol.601 559(1980))、エーテル注入法 (Deamer, D. W. :Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol.308 250(1978))、界面活性剤法 (Brunner, J., et al: Biochim. Biophys. Acta, Vol.455 322(1976))等を用いて製造することができる。

【0012】

リポソーム構造を形成するための脂質としてはリン脂質、コレステロール類や窒素脂質等が用いられるが、一般的にはリン脂質が好適であり、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン、等の天然リン脂質、あるいはこれらを常法によって水素添加したものの他、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エレオステアロイルホスファチジルセリン等の合成リン脂質等を使用することができる。

【0013】

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることもできるが、2種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内に持つものを用いることにより、電氣的に陰性なデオキシヌクレオチドの結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリルアミン、 $\alpha$ -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。

【0014】

このようにして得られるリポソームは患部の細胞または目的とする組織の細胞内に取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えばセンダイウイルス、不活化センダイウイルス、センダイウイルスより精製された膜融合促進蛋白質、ポリエチレングリコール等を加えることができる。

リポソーム製剤の製造法の例を具体的に説明すると、たとえば前記したリポソーム形成物質をコレステロール等と共にテトラヒドロフラン、クロロホルム、エ

タノール等の有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて減圧下に溶媒を留去して容器内面にリポソーム形成物質の膜を形成する。これにNF- $\kappa$ Bのデコイを含有する緩衝液を加えて攪拌し、得られたリポソームにさらに所望により前記した膜融合促進物質を加えた後、リポソームを単離する。このようにして得られるNF- $\kappa$ Bのデコイを含有するリポソームは適当な溶媒中に懸濁させるか、或いはいったん凍結乾燥したものを適当な溶媒に再分散させて治療に用いることができる。膜融合促進物質はリポソーム単離後、使用までの間に加えてもよい。

#### 【0015】

この様にして得られたNF- $\kappa$ Bのデコイを主成分として含有する製剤における、デコイの含有割合は、適用疾患、適用部位、投与形態および投与方法に応じて種々設定することができる。

この様にして得られるNF- $\kappa$ Bのデコイを含有する脳保護剤は、疾患の種類、使用するデコイの種類等により各種の方法で投与することができ、例えば、大槽（くも膜下）内等に投与すればよい。

#### 【0016】

NF- $\kappa$ Bのデコイの投与量は、年齢その他患者の条件、疾病の種類、使用するデコイの種類等により適宜選択されるが、例えば大槽内投与等では一般には1回あたり10から10、000nmoleを適時投与する事ができる。

以下に本発明の実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例

##### モデル動物の作成

実験動物として、2-2.5kgの雄性ニュージーランド白ウサギを用いた。実験動物はペントバルビツールを20mg/kg静脈内に注射し麻酔した。耳介動脈にカニューレを挿入し動脈血を採取した。頭部を定位フレームで固定し、項部筋を収縮させることにより、環椎後頭骨膜を露出させた。脳脊髄液を1ml除いた後、大槽（くも膜下）に1mg/kgの自家血を27ゲージのニードルを用いて3分以上かけて注意深く注入した。その後、動物の脳底動脈を自家血で覆うように動物の頭部を30分間、下げた状態に置き、くも膜下出血モデルを作成した。

## デコイの投与

ウサギNF- $\kappa$ B結合認識配列(20mer) (NF- $\kappa$ B デコイ群) およびスクランブルNF- $\kappa$ B結合認識配列(20mer) (スクランブルデコイ群) を合成し(Ray, A., Gao, X. & Ray, B. J. Biol. Chem. 270, 29201-29208(1995)参照)、カチオン性リポソーム投与システム(Tfx50 promega, WI, U.S.A.) を用いて、くも膜下出血作成2日前に大槽内に投与した。

評価はくも膜下出血作成3日前、及び4日後に血管撮影を施行し、脳底動脈の血管径の変化率を測定した。また、ヘマトキシリン-エオシン(Hematoxylin-eosin) 染色にて組織学的検索を行った。NF- $\kappa$ B の活性に関しては、ゲルシフト法を用いて評価した。

## 結果

脳血管撮影上、コントロール群、スクランブルデコイ投与群では69%まで狭小化を認めたが、NF- $\kappa$ B投与群では約90%と著明な血管収縮の抑制を認めた。

組織学的にも、コントロール群、スクランブルデコイ投与群では著しい血管径の狭小化を認めたが、NF- $\kappa$ Bデコイ投与群では、正常血管とほとんど同様の組織像であった。また、ゲルシフト法ではコントロール群に比べ、NF- $\kappa$ Bデコイ投与群で明らかに活性が抑制された。

特平 9-180050

【書類名】 要約書

【解決手段】 NF- $\kappa$ Bのデコイを含有する製剤を、脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護剤として用いる。

【効果】 脳疾患に起因する脳障害に対する脳保護剤として顕著な効果があった。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000005245

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

【氏名又は名称】

藤沢薬品工業株式会社

特平 9-180050

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005245]

1. 変更年月日

1990年 8月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

氏 名

藤沢薬品工業株式会社